MANUEL TECHNIQUE

Kit Maxwell® CSC RNA FFPE

Mode d'emploi du produit **AS1360**

Ce produit est destiné à être vendu uniquement aux États-Unis et au Canada.

Attention: manier les cartouches avec précaution – les bords de la bande adhésive peuvent être tranchants.



Revised 1/15
TM404

Kit Maxwell® CSC RNA FFPE

Toute la documentation technique est disponible à l'adresse : www.promega.com/protocols/
Veuillez consulter ce site Internet pour vérifier que vous utilisez la version la plus à jour de ce manuel technique.
Si vous avez des questions sur l'utilisation de ce système, veuillez contacter le service technique de Promega à l'adresse techserv@promega.com.



1. Description

Le Kit Maxwell® CSC RNA FFPE est utilisé en conjonction avec l'appareil Maxwell® pour permettre la purification automatisée, efficace et aisée d'ARN à partir d'échantillons de tissus mammaires, pulmonaires ou colorectaux humains fixés au formol et inclus en paraffine (FFPE). L'appareil Maxwell® CSC est fourni avec des méthodes préprogrammées de purification. Il est conçu pour être utilisé avec des cartouches de réactifs pré-dispensés et des réactifs supplémentaires fournis dans le kit, pour une simplicité et une facilité d'emploi maximales. Cet appareil peut traiter jusqu'à 16 échantillons en moins de 60 minutes. L'ARN purifié peut être utilisé directement dans diverses applications ultérieures, telles que la RT-PCR.

Le Kit Maxwell® CSC RNA FFPE purifie les acides nucléiques à l'aide de particules paramagnétiques, offrant une phase solide mobile permettant d'optimiser la capture des échantillons, le lavage et la purification de l'ARN. Le Maxwell® CSC est un appareil de manipulation des particules magnétiques. Ce système permet à l'ARN de se lier efficacement aux particules paramagnétiques dans le premier puits d'une cartouche préremplie et fait progresser l'échantillon d'un puits à l'autre de la cartouche en le mélangeant au cours du traitement. Cette approche de capture magnétique évite certains problèmes courants propres à d'autres systèmes de manipulation de liquides fréquemment utilisés, tels que l'obstruction des cônes de pipettes ou le transfert incomplet des réactifs, qui peuvent entraîner une purification suboptimale.

2. Composants du produit et conditions de stockage

PRODUIT	CONDITIONNEMENT	RÉF.
Kit Maxwell® CSC RNA FFPE	**48 préparations**	**AS1360**

Pour le diagnostic in vitro. Destiné à un usage professionnel uniquement. Contient assez de réactifs pour 48 purifications automatisées à partir d'échantillons de tissus fixés au formol et inclus en paraffine (FFPE). Les cartouches Maxwell® CSC sont à usage unique. Comprend :

- 25 ml Huile minérale
- 20 ml Tampon de lyse
- 2 ×1 ml Protéinase K
- 100 µl Colorant bleu
- 2 × 1 ml $MnCl_2$ à 0,09 M
- 1 ml Tampon de DNase
- 3 flacons DNase I (lyophilisée)
- 48 Cartouches Maxwell® FFPE
- 50 Plongeurs CSC/RSC
- 50 Tubes d'élution (0,5 ml)
- 25 ml Eau sans nucléases

Conditions de stockage : stocker le Kit Maxwell® CSC RNA FFPE à température ambiante (entre 15 et 30 °C). Stocker la DNase I réhydratée entre -10 et -30 °C. Ne pas recongeler/décongeler plus de 10 fois.

Informations relatives à la sécurité : les cartouches de réactifs contiennent de l'éthanol et de l'isopropanol. Ces substances doivent être considérées comme étant inflammables, nocives et irritantes. Les cartouches Maxwell® CSC sont conçues pour être utilisées avec des substances potentiellement infectieuses. Les utilisateurs doivent être munis de protection individuelle appropriée (par ex., gants et lunettes étanches) pour la manipulation de ces substances infectieuses. Il convient de suivre les directives de l'établissement concernant la manipulation et l'élimination de toute substance infectieuse utilisée en conjonction avec ce système.

Attention : manier les cartouches avec précaution – les bords de la bande adhésive peuvent être tranchants.

Informations supplémentaires : les composants du kit Maxwell® CSC RNA FFPE ont été validés et des contrôles de qualité ont été menés pour s'assurer qu'ils fonctionnent ensemble. Il n'est pas recommandé de mélanger des composants de plusieurs lots de kits. Utiliser uniquement les composants fournis dans le kit.

Symbole	Explication	Symbole	Explication
IVD	Dispositif médical de diagnostic in vitro	PROMEGA 2800 Woods Hollow Rd. Madison, WI USA	Fabricant
15°C 30°C	Stocker à 15-30°C.		Nocif. Irritant.
!	Important.		Avertissement. Risque de pincement.
Σ 48 6007TB	Réactifs inclus suffisants pour « n » tests	LOT	Numéro de lot
REF	Numéro de catalogue	2	Ne pas réutiliser.



3. Indication du produit

Le Kit Maxwell® CSC RNA FFPE est conçu pour être utilisé en conjonction avec l'appareil Maxwell® CSC et la méthode de purification Maxwell® CSC RNA FFPE comme dispositif médical de diagnostic in vitro (DIV) pour isoler l'ARN automatiquement à partir d'échantillons de tissus mammaires, pulmonaires ou colorectaux humains fixés au formol et inclus en paraffine (FFPE). L'ARN purifié est adapté aux essais de diagnostic in vitro fondés sur l'amplification.

Le Kit Maxwell® CSC RNA FFPE doit être utilisé entre 15 et 30 °C. Toute utilisation en dehors de cette plage de température peut entraîner des résultats suboptimaux.

Les échantillons de tissus fixés au formol tamponné neutre à 10 % peuvent être utilisés avec le Kit Maxwell® CSC RNA FFPE.

Le Kit Maxwell® CSC RNA FFPE n'est pas destiné à être utilisé comme test spécifique de diagnostic.

Le Kit Maxwell® CSC RNA FFPE est destiné à un usage professionnel uniquement. Les résultats de diagnostic obtenus à l'aide de l'ARN purifié avec ce système doivent être interprétés conjointement à d'autres données cliniques ou de laboratoire.

4. Limites d'utilisation du produit

Le Kit Maxwell® CSC RNA FFPE est conçu uniquement pour être utilisé avec des d'échantillons de tissus mammaires, pulmonaires ou colorectaux humains fixés au formol et inclus en paraffine. Il n'est pas conçu pour être utilisé avec des échantillons de tissus non fixés au formol et inclus en paraffine tels quel les échantillons de tissus frais ou congelés, ou avec des échantillons FFPE d'autres tissus que les tissus mammaires, pulmonaires ou colorectaux humains. Le Kit Maxwell® CSC RNA FFPE n'est pas conçu pour être utilisé avec d'autres types d'échantillons, notamment les tissus non humains, ou pour la purification de l'ADN.

Le Kit Maxwell® CSC RNA FFPE n'est pas conçu pour être utilisé avec des échantillons de tissus préparés à l'aide de fixatifs autres que le formol tamponné neutre à 10 %.

Les performances du Kit Maxwell® CSC RNA FFPE ont été évaluées en isolant de l'ARN à partir d'échantillons de tissus FFPE de tailles comprises entre 0,1 et 2,0 mm^3. Ce kit ne doit pas être utilisé avec des échantillons en dehors de cette plage.

L'utilisateur est tenu de valider la performance des acides nucléiques purifiés dans les applications de diagnostic ultérieures. Des contrôles appropriés doivent être inclus dans les applications de diagnostic ultérieures qui utilisent l'ARN purifié à l'aide du Kit Maxwell® CSC RNA FFPE.



5. Avant de commencer

Matériel à fournir par l'utilisateur

- microcentrifugeuse
- pipettes et cônes pour le prétraitement et le transfert des échantillons dans les cartouches de réactifs préremplies
- tubes de 1,5 à 2,0 ml pour l'incubation des échantillons (par ex. microtubes de 1,5 ml, Réf. V1231)
- blocs chauffants réglés à 56 °C et à 80 °C. **Remarque :** les blocs chauffants doivent être préchauffés à la température souhaitée. La température réelle des blocs chauffants doit être mesurée en tenant compte de la plage d'étalonnage du thermomètre utilisé.
- échantillons FFPE ayant un volume de tissus total de 0,1 à 2,0 mm^3. L'épaisseur de la section ne doit pas dépasser 5 µm. **Remarque :** les échantillons doivent être stockés à température ambiante (15–30 °C).
- lames de rasoir. **Remarque :** soyez prudent lors de l'utilisation d'une lame de rasoir pour détacher un échantillon de la lame de microscope.

  Si nécessaire, reconstituez un flacon de DNase I lyophilisée avec 275 µl d'eau sans nucléases. Inversez le flacon pour resuspendre la DNase I présente en dessous du capuchon, puis mélangez en tournant doucement (ne pas mélanger au vortex).

5.A. Préparation des échantillons FFPE

Prétraitement des sections de tissus

1. Placez la section dans un tube à microcentrifugation de 1,5 ml. En cas d'utilisation de sections de tissus montées sur des lames de microscope, détachez chaque section à l'aide d'une lame de rasoir propre.
2. Ajoutez 300 µl d'huile minérale aux tubes contenant les échantillons. Mélangez au vortex pendant 10 secondes.
3. Chauffez les échantillons à 80 °C pendant 2 minutes. Placez les échantillons à température ambiante lors de la préparation du mélange maître.
4. Préparez un mélange maître contenant le tampon de lyse, la protéinase K et le colorant bleu selon le tableau ci-dessous.

Réactif	Quantité par réaction	Réactions (nombre souhaité +1)	Total
Tampon de lyse	224 µl	n +1	224 µl × (n +1)
Protéinase K	25 µl	n +1	25 µl × (n +1)
Colorant bleu	1 µl	n +1	1 µl × (n +1)

5. Ajoutez 250 µl de mélange maître à chaque tube d'échantillon et passez au vortex pendant 5 secondes.
6. Centrifugez les tubes d'échantillons à 10 000 × *g* pendant 20 secondes pour séparer les couches. Si un culot est présent dans la phase aqueuse (couche inférieure, bleue), mélangez doucement pour le resuspendre. Laissez les deux phases dans le tube.
7. Transférez les tubes d'échantillons au bloc chauffant à 56 °C et incubez pendant 15 minutes.
8. Transférez les tubes d'échantillons au bloc chauffant à 80 °C et incubez pendant 1 heure.
9. Retirez les tubes d'échantillons du bloc chauffant et laissez-les refroidir à température ambiante pendant 15 minutes. Pendant que les échantillons refroidissent, préparez le cocktail de DNase I tel que décrit à l'étape 10.



5.A. Préparation des échantillons FFPE (suite)

10. Préparez un cocktail contenant $MnCl_2$, tampon de DNase et DNase I dans l'ordre indiqué ci-dessous :

Réactif[1]	Quantité par réaction	Réactions (nombre souhaité +1)	Total
$MnCl_2$ à 0,09 M	26 µl	n +1	26 µl × (n +1)
Tampon de DNase[2]	14 µl	n +1	14 µl × (n +1)
DNase I [3]	10 µl	n +1	10 µl × (n +1)

[1]Si les réactifs du cocktail de DNase sont ajoutés individuellement dans les tubes d'échantillons, assurez-vous de les ajouter dans l'ordre indiqué ci-dessus. Mélangez soigneusement chaque réactif avec une pipette avant d'ajouter le réactif suivant.

[2]Le tampon de DNase doit être stocké entre 15 et 30 °C ; il est susceptible de former un précipité à des températures plus basses. Si le tampon contient un précipité, celui-ci peut être resolubilisé en chauffant le tube pendant 2 minutes à 56 °C puis en le mélangeant brièvement au vortex.

[3]S'il reste de la DNase I reconstituée, stockez-la entre -30 et -10 °C.

11. Ajoutez 50 µl de cocktail de DNase à chaque tube. Mélangez en pipetant 10 fois.
12. Incubez les tubes d'échantillons à température ambiante (15–30 °C) pendant 15 minutes.
13. Centrifugez les tubes d'échantillons dans une microcentrifugeuse pendant 5 minutes à la vitesse maximale.
14. Transférez immédiatement la phase aqueuse bleue dans le puits n° 1 d'une cartouche Maxwell® CSC. Veuillez consulter la Section 5.B. concernant les instructions de préparation des cartouches.

5.B. Préparation des cartouches Maxwell® CSC

1. Changez de gants avant de manipuler les cartouches Maxwell® CSC, les plongeurs CSC/RSC et les tubes d'élution. Les cartouches sont placées sur le portoir de la plateforme Maxwell® CSC en dehors de l'appareil, et le portoir contenant les cartouches et échantillons est alors transféré à l'appareil pour procéder à la purification. Placez les cartouches à utiliser sur le portoir de la plateforme Maxwell® CSC (Figure 2). Placez chaque cartouche sur le portoir de la plateforme, en vous assurant que le puits n° 1 (le plus grand puits de la cartouche) est le plus éloigné du tube d'élution. Appuyez verticalement sur la cartouche pour bien l'engager dans le portoir. Vérifiez que les deux extrémités de la cartouche sont engagées à fond dans le portoir de la plateforme. Retirez soigneusement la bande adhésive de protection de manière à la retirer intégralement du haut de la cartouche. Assurez-vous que toutes les bandes adhésives et tous les résidus de colle soient bien retirés de la cartouche.

   Attention : maniez les cartouches avec précaution. Les bords de la bande adhésive peuvent être tranchants.

2. Placez un plongeur dans le puits n° 8 de chaque cartouche.

   Remarque : utilisez uniquement les plongeurs fournis dans le Kit Maxwell® CSC RNA FFPE. Les plongeurs des Kits Maxwell® 16 LEV et SEV ne sont pas compatibles avec l'appareil Maxwell® CSC.



3. Pour chaque cartouche, placez un tube d'élution vide à l'emplacement prévu à cet effet dans le portoir de la plateforme Maxwell® CSC.

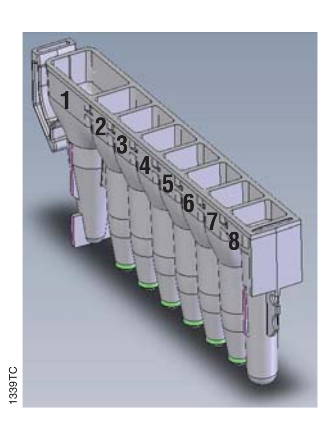
   Remarque : utilisez uniquement les tubes d'élution fournis dans le Kit Maxwell® CSC RNA FFPE. Les autres tubes d'élution peuvent ne pas être compatibles avec l'appareil Maxwell® CSC et peuvent influencer le processus de purification de l'ARN.

4. Ajoutez 50 µl d'eau sans nucléases au fond de chaque tube d'élution. Les tubes d'élution doivent rester ouverts lors de la purification de l'ARN.

   Remarque : utilisez uniquement l'eau sans nucléases fournie dans le Kit Maxwell® CSC RNA FFPE. L'utilisation d'un autre tampon d'élution peut influencer la purification de l'ARN ou son utilisation ultérieure.

Remarques concernant la préparation des cartouches

1. Si vous traitez moins de 16 échantillons, centrez les cartouches sur le portoir de la plateforme.
2. Les éclaboussures d'échantillons ou de réactifs présentes sur toute surface du portoir de la plateforme Maxwell® CSC doivent être nettoyées comme indiqué dans le *Manuel de l'appareil Maxwell® CSC*, nº TM373. N'utilisez d'eau de javel sur aucune partie de l'instrument.



1. Solution de liaison
2. Particules magnétiques
3. Solution de lavage
4. Solution de lavage
5. Solution de lavage
6. Solution de lavage
7. Vide
8. Vide

Contenu des puits à ajouter par l'utilisateur

1. Échantillon prétraité
8. Plongeur CSC/RSC

Figure 1. Cartouche Maxwell® CSC. Cette figure illustre le contenu d'une cartouche. L'échantillon FFPE prétraité est ajouté au puits nº 1, et un plongeur est ajouté au puits nº 8.



Figure 2. Installation et configuration du portoir de la plateforme Maxwell® CSC. L'eau sans nucléases est ajoutée aux tubes d'élution comme indiqué.



6. Exécution de l'appareil

La méthode Maxwell® CSC RNA FFPE peut être téléchargée à partir du site Internet de Promega : **www.promega.com/resources/tools/maxwellcscmethod**. Veuillez consulter le *Manuel technique d'installation des méthodes Maxwell® CSC*, nº TM401, pour de plus amples informations.

Si vous pensez que votre appareil pourrait être contaminé par des RNases, nettoyez-le avant la procédure à l'aide d'une solution de détergent telle que Steris® LpH®. Suivez les instructions de la section Nettoyage et entretien du *Manuel d'utilisation de l'appareil Maxwell® CSC*, nº TM373.

1. Mettez sous tension l'appareil Maxwell® CSC et la tablette. L'interface utilisateur de l'appareil va démarrer automatiquement, réaliser une vérification et mettre en position toutes les pièces mobiles.
2. Sélectionnez « Start » (Démarrer) à partir de l'écran d'Accueil.
3. Scannez le code-barres de l'étiquette du Kit Maxwell® CSC RNA FFPE ou saisissez-le manuellement afin de sélectionner automatiquement la méthode à exécuter (Figure 3).

   Remarque : le code-barres de la méthode du Kit Maxwell® CSC RNA FFPE est requis pour pouvoir purifier l'ARN sur l'appareil Maxwell® CSC. L'étiquette du kit contient deux codes-barres. Celui de la méthode est indiqué dans la Figure 3 ci-dessous. Si le code-barres ne peut pas être scanné, contactez le service technique de Promega.



Figure 3. Étiquette du kit indiquant l'emplacement du code-barres à scanner pour charger la méthode. Le code-barres de la méthode devant être scanné sur l'étiquette du kit pour démarrer une purification est encadré en rouge.

4. Sélectionnez la position des cartouches à traiter (consultez le *Manuel d'utilisation de l'appareil Maxwell® CSC*, nº TM373) et scannez ou saisissez manuellement les données de suivi des échantillons. Le cas échéant, désélectionnez les positions non utilisées. Une fois que toutes les informations des échantillons ont été saisies, sélectionnez « Proceed » (Continuer).
5. Sur la tablette, vérifiez que les échantillons ont été ajoutés au puits nº 1 des cartouches (comme indiqué à la Section 5.A), que les cartouches sont chargées dans l'appareil, que les tubes d'élution contenant 50 µl d'eau sans nucléases sont présents et ouverts, et que les plongeurs ont été placés dans le puits nº 8.



6. Transférez le portoir de la plateforme Maxwell® CSC contenant les cartouches préparées dans l'appareil. Vérifiez que le portoir est placé dans l'appareil Maxwell® CSC de façon à ce que les tubes d'élution se trouvent du côté de la porte. Le portoir ne peut être inséré dans l'appareil que dans cette orientation. Si vous avez du mal à insérer le portoir sur la plateforme, vérifiez que celui-ci est dans la bonne orientation. Assurez-vous de placer le portoir horizontalement sur la plateforme.

   Remarque : tenez le portoir de la plateforme Maxwell® CSC sur les côtés pour éviter d'en déloger les cartouches.

   Avertissement : Risque de pincement.

7. Vérifiez que toutes les étapes de prétraitement requises ont été effectuées, puis appuyez sur « Start » (Démarrer) pour fermer la porte de l'appareil et démarrer la purification.

8. L'appareil Maxwell® CSC commencera immédiatement le cycle de purification. L'écran affichera les étapes effectuées ainsi que le temps approximatif restant dans le cycle.

   Remarque : si le cycle est annulé avant la fin, l'appareil libèrera les particules des plongeurs et éjectera ces derniers dans le puits n° 8 de la cartouche. Les échantillons seront perdus. Il est inutile de tenter de repurifier des échantillons après l'annulation du traitement de l'appareil.

9. À l'issue du cycle de purification automatisée, l'écran de la tablette affichera un message indiquant que la méthode est finie : « End of Run » (Fin du cycle).

Fin du cycle

10. À la fin de la méthode, suivez les instructions à l'écran pour ouvrir la porte. Vérifiez que les plongeurs sont placés dans le puits n° 8 de la cartouche à la fin du cycle. Retirez le portoir de la plateforme de l'appareil et récupérez les échantillons élués du portoir. Si les plongeurs n'ont pas été éjectés de la barre de fixation des plongeurs, suivez les instructions à l'écran pour effectuer la méthode de Clean Up (Nettoyage) pour un cycle annulé, ou sélectionnez cette même méthode à partir de l'écran Settings (Paramètres) pour un cycle terminé normalement. Ceci éjectera les plongeurs encore attachés.

11. Immédiatement après le cycle, pour éviter l'évaporation des éluats, refermez les tubes d'élution contenant l'ARN et retirez-les de l'appareil. Retirez le portoir de l'appareil Maxwell® CSC.

    Remarque : tenez le portoir sur les côtés en le retirant de l'appareil. Assurez-vous que les échantillons ont été retirés de l'appareil avant d'exécuter le protocole de décontamination par UV pour éviter d'endommager les acides nucléiques purifiés. Les échantillons d'ARN peuvent être stockés entre -30 et -10 °C pour une nuit ou à une température inférieure à -60 °C pour stockage à long terme.

12. Retirez les cartouches et les plongeurs du portoir de la plateforme Maxwell® CSC et éliminez le tout en tant que déchets dangereux selon les procédures de votre établissement. Les cartouches, plongeurs et tubes d'élution sont à usage unique. Ne réutilisez pas les cartouches Maxwell® CSC, les plongeurs CSC/RSC ou les tubes d'élution.

7. Après la purification

Déterminez si le rendement des échantillons d'ARN et leur pureté répondent aux exigences des essais diagnostiques ultérieurs avant de les utiliser. Les performances du kit ont été évaluées en fonction de la purification d'ARN pouvant être amplifié. D'autres méthodes de quantification, telles que l'absorbance ou la liaison de colorants fluorescents, peuvent présenter une mauvaise corrélation avec l'amplification (1). Les lectures d'absorbance des échantillons FFPE pouvant surestimer le rendement, il est recommandé d'utiliser des méthodes de quantification plus spécifiques (1).



8. Dépannage

Pour toute question qui ne serait pas traitée ci-dessous, veuillez consulter une succursale ou un distributeur Promega local. Les coordonnées de ceux-ci sont disponibles au site : **www.promega.com**. Adresse électronique : **techserv@promega.com**

Symptômes	Causes possibles et commentaires
Concentration en ARN de l'éluat plus faible que prévu (Une section ordinaire devrait produire de l'ARN amplifiable, en fonction de la taille et de la cellularité du tissu, des conditions de fixation au formol et de la manipulation.)	Les performances du Kit ont été évaluées en isolant de l'ARN à partir d'échantillons de tissus FFPE de tailles comprises entre 0,1 et 2,0 mm^3. Ce kit n'est pas conçu pour les échantillons en dehors de cette plage. Utiliser des sections de taille appropriée.
	Ce kit a été conçu pour être utilisé avec des échantillons de tissus mammaires, pulmonaires ou colorectaux humains fixés au formol et inclus en paraffine. Il n'a pas été conçu pour être utilisé avec des échantillons de tissus non fixés au formol et inclus en paraffine tels quel les échantillons de tissus frais ou congelés, ou avec des échantillons FFPE d'autres tissus que les tissus mammaires, pulmonaires ou colorectaux humains. Les températures et durées d'incubation n'ont été testées qu'avec des échantillons de tissus mammaires, pulmonaires et colorectaux humains. N'utiliser que des tissus mammaires, pulmonaires ou colorectaux humains.
	Ce kit n'est pas conçu pour être utilisé avec des échantillons de tissus préparés à l'aide de fixatifs autres que le formol tamponné neutre à 10 %. Confirmer qu'un autre fixatif n'a pas été utilisé.
	Des RNases peuvent avoir été introduites lors du traitement ou de la quantification des échantillons. Reportez-vous à la section 9 pour des informations concernant l'établissement d'un environnement sans ribonucléases.
	Le tissu utilisé provenait d'une lame ou section colorée. Aucune revendication n'est faite dans le cas des lames ou sections colorées. Répéter la purification avec une lame ou section non colorée.
	Les performances du kit ont été évaluées en fonction de la purification d'ARN pouvant être amplifié. D'autres méthodes de quantification, telles que l'absorbance ou la liaison de colorants fluorescents, peuvent présenter une mauvaise corrélation avec l'amplification. Utiliser une méthode de quantification basée sur l'amplification pour évaluer le rendement.



8. Dépannage (suite)

Symptômes	Causes possibles et commentaires
Qualité moins bonne que prévu. (L'éluat contient de l'ARN principalement fragmenté ou des inhibiteurs qui interfèrent avec les essais ultérieurs.)	La fixation au formol et l'inversion ultérieure de la réticulation provoquent la fragmentation de l'ARN. Si l'ARN est fragmenté avant la purification, l'ARN purifié avec ce kit le sera également. Répéter avec une section adjacente pour déterminer si la section utilisée ou la procédure est en cause.
	Certains essais d'amplification sont particulièrement sensibles à la présence d'inhibiteurs. Des contrôles appropriés de l'essai ultérieur devraient permettre d'identifier la présence d'un inhibiteur de l'amplification dans l'éluat. Il incombe à l'utilisateur de vérifier la compatibilité de ce produit avec tous les essais ultérieurs.
ADN présent dans les éluats. (Les éluats sont contaminés par de l'ADN, ce qui peut interférer avec les essais ultérieurs.)	Le cocktail de DNase ajouté aux échantillons représente un excès d'activité de désoxyribonucléase pour les échantillons de tissus FFPE d'une taille comprise entre 0,1 et 2,0 mm^3. Ce cocktail n'est pas conçu pour les échantillons en dehors de cette plage et peut s'avérer suboptimal dans ce cas. Utiliser des sections de taille appropriée.
	Si le cocktail de DNase n'a pas été mélangé suffisamment aux échantillons au cours du prétraitement, la dégradation de l'ADN peut être incomplète. Assurez-vous de mélanger soigneusement les échantillons après ajout du cocktail de DNase.
	Si les constituants du cocktail de DNase sont ajoutés séparément à l'échantillon, assurez-vous de les ajouter dans l'ordre indiqué à l'étape 10 de la Section 5.A. En outre, mélangez bien les échantillons au fur et à mesure que les constituants sont ajoutés. Si les constituants sont ajoutés dans un autre ordre ou s'ils ne sont pas mélangés complètement, la DNase peut être inactivée.



9. Annexe

9.A. Établissement d'un environnement sans ribonucléases

Les ribonucléases sont extrêmement difficiles à inactiver. Prenez garde de ne pas introduire de RNases dans vos échantillons d'ARN pendant et après leur purification. Ceci est particulièrement important s'il n'y a qu'une quantité limitée du matériel de départ. Les conseils ci-dessous peuvent aider à éviter la contamination accidentelle de vos échantillons par les RNases.

1. Deux des sources les plus courantes de contamination par RNases sont les mains de l'utilisateur et les bactéries ou moisissures pouvant être présentes dans les poussières de l'air. Pour éviter la contamination provenant de ces sources, utilisez une technique aseptique lors de la manipulation des réactifs fournis dans ce système. Portez des gants à tout moment. Changez de gants chaque fois qu'un contact avec des RNases peut s'être produit.
2. Autant que possible, utilisez des récipients ou fournitures en plastique stériles et jetables pour la manipulation de l'ARN. Ces fournitures ne sont généralement pas contaminées par les RNases et aucun traitement d'inactivation de ces enzymes n'est nécessaire.
3. Traitez les récipients ou fournitures en verre ou en plastique non stériles avant de les utiliser pour s'assurer qu'elles ne contiennent pas de RNases. Incubez les récipients ou fournitures en verre dans des fours à 200 °C pendant toute la nuit. Rincez les récipients ou fournitures en plastique avec une solution de NaOH à 0,1 N et d'EDTA à 1 mM, puis à l'eau sans RNases. Les produits destinés à l'élimination des RNases peuvent également être utilisés selon les instructions du fabricant.
4. Traitez les solutions non fournies dans le système en ajoutant du diéthyl dicarbonate (DEPC) à 0,1 % sous une hotte de laboratoire. Incubez à température ambiante sous agitation pendant toute la nuit sous la hotte. Stérilisez en autoclave pendant 30 minutes pour éliminer les traces de DEPC.

   Attention : le DEPC est un cancérogène présumé et ne doit être utilisé que sous une hotte de laboratoire. Le DEPC réagit rapidement avec les amines et, de ce fait, ne peut pas être utilisé pour les solutions tamponnées au Tris.

   Remarque : il est essentiel de continuer à protéger vos échantillons d'ARN contre les RNases dans toutes les procédures ultérieures.

9.B. Référence

1. Bonin, S. *et al.* (2010) Multicentre validation study of nucleic acids extraction from FFPE tissues. *Virchows Arch.* **457**, 309–17.

10. Summary of Changes

The following change was made to the 1/15 revision of this document:

1. Updated component name from Plongeurs CSC to Plongeurs CSC/RSC.


Promega